

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/16792 (43) Date de publication internationale: 22 juin 1995 (22.06.95)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB94/00414</p> <p>(22) Date de dépôt international: 13 décembre 1994 (13.12.94)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 3761/93-3 16 décembre 1993 (16.12.93) CH</p> <p>(71)(72) Déposants et inventeurs: STROUN, Maurice [FR/CH]; 6, rue Pedro-Meylan, CH-1208 Genève (CH). ANKER, Philippe [CH/CH]; 335, rue de Bernex, CH-1233 Bernex (CH). VASIOUKHIN, Valeri [RU/US]; 320 North Austin Boulevard #5, Oak Park, IL 60302 (US).</p> <p>(74) Mandataire: MICHELI & CIE; 122, rue de Genève, Case postale 61, CH-1226 Thônex (CH).</p>		<p>(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING CANCER

(54) Titre: METHODE POUR LE DIAGNOSTIC DE CANCERS

(57) Abstract

A method for diagnosing and/or monitoring the development of cancer by analysing the deoxyribonucleic acid (DNA) in blood plasma, and particularly by detecting any gene alterations in cancer cell DNA, e.g. oncogene mutations or deletions, tumour suppressor gene mutations or deletions, or microsatellite alterations.

(57) Abrégé

La méthode selon l'invention pour le diagnostic et/ou le suivi de l'évolution de cancers comprend l'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans le plasma sanguin. Cette analyse concerne plus particulièrement toute modification génique propre à l'ADN de cellules cancéreuses, par exemple la détection de mutations ou délétions d'oncogènes, ou bien de mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs ou encore les modifications de microsatellites.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	JO	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	JP	Malte
BE	Belgique	GN	Grenade	KE	Niger
BR	Brésil	GR	Grece	KR	Pays-Bas
CA	Canada	GD	Madagascar	KU	Norvège
CH	Suisse	IR	Irlande	KW	Nouvelle-Zélande
CL	Chili	IT	Italie	KZ	Philippines
CO	Colombie	JP	Japon	LK	Portugal
CR	Costa Rica	KZ	Kosovo	LR	Republique
CU	Cuba	KG	Kirghizistan	MD	Republique de Moldova
CY	Cyprus	KP	République populaire démocratique	ME	Russie
DE	Allemagne	CR	de Corée	MH	Sainte-Lucie
DK	Danemark	KD	République de Corée	ML	Singapour
DO	Costa d'Ivoire	KM	Kazakhstan	MT	Sierra Leone
ES	Espagne	LI	Lithuanie	MR	Singapour
FI	Finlande	LK	Sri Lanka	MU	Tadjikistan
FR	France	LS	Lettland	MU	Tchad
GB	Grande-Bretagne	LV	LITUANIE	MY	Togo
GR	Greece	MC	Luxembourg	TD	Tadjikistan
IE	Irelande	MD	République de Moldova	TM	Tchad
IL	Israël	MG	Madagascar	TO	Togo
IN	Inde	ML	Maldives	TT	Tadjikistan
IS	Islande	MO	Monaco	UG	Timor-O-Timor
IT	Italie	MT	Malte	US	Ukraine
JP	Japon	MU	Sainte-Lucie	VA	Etats-Unis d'Amérique
KR	Corée	ML	Tadjikistan	VN	Ouganda
KU		MO	Monaco		Viet Nam

- 1 -

METHODE POUR LE DIAGNOSTIC DE CANCERS

La présente invention concerne une méthode de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de divers types de cancers après un traitement de chimiothérapie ou après une opération.

On sait que le diagnostic et le suivi de l'évolution des cancers sont effectués, à part l'observation et l'examen direct de tumeurs, par analyse de biopsies ou, dans le cas de cancers du sang, de la moelle osseuse, ce qui implique soit une intervention chirurgicale soit un test invasif du type biopsie ou aspiration médullaire avec aiguille. Or, en plus du caractère désagréable voire dangereux pour les patients de telles méthodes, il a été constaté qu'elles pouvaient en outre être peu précises. Dans le cas de certaines maladies leucémiques par exemple, l'analyse de l'échantillon de moelle prélevée n'a pas permis de retrouver toutes les variétés clonales malignes.

Le but de cette invention consiste donc à fournir une méthode de diagnostic de cancers qui soit d'une part plus précise et plus fiable et d'autre part qui soit plus facile à réaliser et n'impliquant pas de test invasif sur les patients.

La méthode de diagnostic et/ou suivi de l'évolution de cancers, objet de l'invention et visant à atteindre le but précité, comprend l'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans le plasma sanguin.

- 2 -

Il a en effet maintenant pu être démontré que des patients atteints de différentes maladies cancéreuses présentaient des taux augmentés d'ADN dans le plasma sanguin. La méthode de diagnostic selon l'invention est donc basée sur la détection de mutations géniques dans cet ADN plasmatique, la plasma sanguin étant un matériau humain beaucoup plus facilement accessible que des biopsies de tumeurs par exemple. Ainsi, des mutations d'oncogènes sont fréquemment mises en évidence dans de nombreux types de tumeurs malignes, et parmi elles les mutations du gène ras sont particulièrement significatives. Toutefois, la méthode peut s'appliquer à n'importe quelle modification génique propre à l'ADN de cellules cancéreuses, telles les mutations ou délétions de gènes ras, APC, DCC, P53, etc. ou de n'importe quel oncogène ou antioncogène (gène de suppression de tumeurs) ou encore les modifications de microsatellites. On a même observé que différentes mutations des gènes ras détectées dans l'ADN du plasma sanguin pouvaient être absentes dans l'ADN des cellules sanguines périphériques ou dans le cas de certains patients leucémiques de la moelle osseuse, ce qui tend à confirmer la plus grande fiabilité de la méthode selon l'invention en comparaison avec les méthodes de diagnostic connues.

D'une manière générale, la méthode de diagnostic selon l'invention consiste à extraire l'ADN du plasma sanguin, à purifier et amplifier cet ADN, puis à déterminer les mutations ou délétions géniques dans celui-ci, ceci en principe de manière comparative entre le plasma sanguin d'une personne présumée malade et celui de personnes en bonne santé.

- 3 -

La portée de la présente invention s'étend à toute technique d'extraction, purification et amplification d'ADN du plasma sanguin; de même, n'importe quelle méthode de détermination des mutations géniques peut être utilisée.

La méthode de diagnostic selon l'invention sera maintenant illustrée plus en détails en référence aux deux exemples qui suivent :

Exemple 1 : Diagnostic du cancer du colon par détection de mutations du gène K-ras.

Dans cette première application de la méthode selon l'invention, on a utilisé la détermination de mutations dans le codon 12 des gènes K-ras contenus dans des adénocarcinomes du colon. Ces mutations apparaissent généralement lors de la transition du stade adénome I en adénome II, avant la délétion ou la mutation du gène P53, c'est-à-dire relativement tôt dans l'évolution de la tumeur.

Des échantillons de sang (20-30 ml) de 15 patients présentant différents stades d'adénocarcinome colorectal ont été prélevés sur héparine, ces patients n'ayant reçu durant cette période aucun médicament anti-cancéreux. Treize des 15 patients ont ensuite subi une ablation chirurgicale de la tumeur; de même, on a également prélevé environ 400 ml de sang au total sur des personnes saines afin d'en isoler l'ADN du plasma.

L'ADN a été extrait des tumeurs et des cellules sanguines selon des techniques usuelles bien connues.

Quant à l'extraction de l'ADN du plasma sanguin, elle peut être effectuée de la manière suivante : le plasma est

- 4 -

d'abord soumis à des traitements par du phénol, de l'éther et du choloroforme. Après dialyse contre la SSC (chlorure de sodium 0,15 M, citrate de trisodium 0,015M), on fait passer le produit à travers une colonne Concanavaline A-Sépharose afin d'éliminer les polysaccharides, puis on le centrifuge dans un gradient de Cs_2SO_4 .

L'ADN ainsi extrait et purifié (10 à 100ng) a ensuite été soumis à une amplification par PCR du premier exon du gène K-ras dans un volume de 100 μ l.

Les amplimers étaient le

5'-GACTGAATATAAAGTTGTGGTAGT-3'

et le
5'-CTATTGTTGGATCATATTCGTCC-3'.

Les amplifications ont été effectuées dans un tampon contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl à pH 8,3, 200 mM de chaque nucléotide, 1,8 mM de MgCl_2 , 0,2 μ M de chaque précurseur et 2,5 unités de "AmpliTaq" ADN polymérase. 35 cycles ont été réalisés pour l'ADN des tumeurs et des cellules sanguines et 45 cycles pour l'ADN du plasma (94°C pendant 1 min., 59°C pendant 1,5 min., 72°C pendant 1 min., le dernier cycle étant prolongé de 7 min. à 72°C).

En ce qui concerne la détection des mutations, elle peut être effectuée par n'importe quelle méthode connue et appropriée. Dans le présent exemple, elle a été réalisée de deux manières différentes pour chaque échantillon testé.

(a) Hybridisation de produits PCR avec sondes oligonucléotiques spécifiques aux mutations (selon Verlaan de Vries et al., Gene 50, 313-320, 1986):

Les produits PCR ont été disposés en quantités égales sur des membranes "Zeta-probe" (Bio-Rad, Hercules, CA) et

- 5 -

hybridisées avec les oligonucléotides spécifiques pour des K-ras mutants ou sauvages. Les oligonucléotides étaient marqués avec ^{32}P ddATP (Amersham, GB). Afin de séparer les hybrides parfaits des "mismatches", le lavage final des membranes a été effectué dans une solution contenant du chlorure de tétraméthylammonium 3M, 50 mM de Tris-HCl à pH 8,0 et 0,2 mM EDTA et 0,1 % SDS à 58°C pendant 1 heure.

(b) Amplification PCR avec amplimers spécifiques de mutations ponctuelles ou amplification PCR pour allèles spécifiques (PASA) (selon Sommer et al, Biotechnique 12, 82-87, 1992):

Dans cette méthode plus sensible, l'ADN est soumis à une amplification PCR avec des amplimers complémentaires aux séquences normales GLY ou mutées ALA, VAL, SER, ASP ou CYS. Les amplimers spécifiques aux mutations ont des terminaisons 3' complémentaires aux mutations au point spécifiques. L'enzyme Taq I polymérase (Perkin-Elmer Cetus, CH), n'a pas d'activité exonucléasique en 3' et est donc incapable d'amplifier l'ADN si le mismatch d'une seule base est situé à la terminaison 3' de l'amplimer.

Chaque PCR a été effectué dans un volume de 40µl d'une solution contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl à pH 8,3; 2 mM de chaque nucléotide, 0,7 mM MgCl₂, 0,2 mM de chaque précurseur et 1 unité de "AmpliTaq" ADN polymérase. Trente-cinq cycles ont été effectués (94°C pendant 1 min., recuit à 55-62°C pendant 2 min., extension à 72°C pendant 1 min.). Le dernier cycle a été étendu de 7 min. à 72°C . Chaque réaction a été amorcée avec la technique "hot-start". Les amplimers utilisés étaient les suivants :

- 6 -

5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG-3' pour le K-ras sauvage (renaturation à 55°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGC-3' pour le mutant ALA 12 (renaturation à 62°C),
5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT-3' pour le mutant VAL 12 (renaturation à 61°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTA-3' pour le mutant SER 12 (renaturation à 59°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3' pour le mutant ASP 12 (renaturation à 60°C),
5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTT-3' pour le mutant CYS 12 (renaturation à 59°C) et dans chaque cas l'amplimer "antisense"
5'-CTATTGTGGATCATATTCGTCC-3'.

Après amplification, les produits de la réaction ont été analysés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 0,8 %.

En utilisant la première technique (a) décrite ci-dessus, il s'est avéré qu'il n'était pas possible de mettre en évidence les mêmes mutations dans l'ADN du plasma que celles détectées dans l'ADN des tumeurs prélevées (GLY en VAL, GYS en ALA); cette technique ne semble pouvoir être appliquée ici que si environ 10 % au moins de l'ADN total présente une mutation ponctuelle. Par contre, les mutations précitées ont pu être identifiées dans l'ADN du plasma avec la seconde technique (b) décrite précédemment; il apparaît que cette technique permet d'identifier les mutations dans un échantillon d'ADN du plasma mélangé avec un excès de 10^4 à 10^5 d'ADN normal non muté. D'autre part, avec la même technique, il n'a pas été possible de détecter les mêmes mutations sur les échantillons d'ADN de cellules sanguine.

Enfin, tous les échantillons de contrôle provenant de personnes en bonne santé se sont révélés négatifs, c'est-

- 7 -

à-dire ne présentant pas de mutations de l'ADN du plasma.

Exemple 2 : Diagnostic de cancers dus à des désordres myéloïdes par détection de mutations du gène N-ras.

On sait qu'une prédominance de mutations N-ras ont été observées dans l'ADN de la moelle osseuse de patients présentant un syndrome myélodysplasique (MDS) ou une leucémie myéloblastique aigüe (AML).

On a prélevé 20 à 30 ml de sang sur dix patients atteints de AML ou MDS, ce sang étant recueilli sur héparine et centrifugé sur gradient "Ficoll Hipsaque" (Pharmacia, SE). On a également prélevé 400 ml de sang sur des personnes saines. L'interphase contenant des cellules mononucléaires a été recueilli et utilisé pour l'extraction de l'ADN des cellules sanguines. La phase supérieure a été centrifugée à 2500 G pendant 15 minutes, et le surnageant a été utilisé pour l'extraction de l'ADN du plasma. De plus, quelques échantillons de moelle osseuse des mêmes patients ont été prélevés pour analyse de contrôle.

L'ADN des cellules sanguines et de la moelle a été isolé par traitement à la Protéinase K (Merck, DE) en présence de SDS, puis extraction au phénol, précipitation à l'éthanol et gradient de Cs₂SO₄. L'ADN du plasma a été extrait comme décrit dans l'exemple 1.

L'ADN (10-100 ng) a été amplifié dans un volume de 100μl. Les amplimères utilisés (Oncogène Science, NY, USA) étaient 5'-GACTGAGTACAAACTGGTGG-3' et 5'-CTCTATGGTGGGATCATATT-3' pour le premier exon du gène N-ras. Les amplifications ont été effectuées dans un

- 8 -

"Thermo-Cycler 480" automatique (Perkin-Elmer Cetus, CH) dans les mêmes conditions que celles de l'Exemple 1. Chaque cycle consistait en une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une renaturation (à 51°C pour N-ras) pendant 1,5 minutes et une extension d'une minute à 72°C avec un troisième segment d'extension de 5 secondes par cycle. Le dernier cycle a été suivi par une extension de 7 minutes à 72°C. Les produits de l'amplification (109 np) ont été analysés par électrophorèse dans du gel polyacrylamide 0,8%.

Les deux mêmes méthodes de détection des mutations que dans l'Exemple 1 ont été employées. Dans la seconde technique (b), on a utilisé comme amplimers pour N-ras 5'-CTGGTGGTGGTGGAGCAGA-3' pour le mutant ASP 12, 5'-GGTGGTGGTGGAGCAGGTT-3' pour le mutant CYS 13, et 5'-CTCTATGGTGGGATCATATT-3' comme amplimer "antisense".

Les résultats des analyses obtenus permettent de confirmer que l'ADN des patients malades présentait une ou plusieurs mutations du codon 12 (GLY en CYS ou en ASP) ou du codon 13 (GLY en CYS) du gène N-ras, alors que toutes ces mutations n'ont pas pu être identifiées dans l'ADN des cellules sanguines, ni même dans celui de la moelle osseuse.

Ainsi, il ressort des deux exemples illustratifs ci-dessus que l'analyse de l'ADN du plasma sanguin peut constituer une méthode de diagnostic et du suivi de l'évolution d'une maladie cancéreuse qui est plus pratique, moins traumatisante (simple prélèvement de sang chez le patient) et parfois même plus fiable que les méthodes connues impliquant le prélèvement d'une biopsie.

- 9 -

REVENDICATIONS

1. Méthode pour le diagnostic et/ou le suivi de l'évolution de cancers comprenant l'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans le plasma sanguin.
2. Méthode selon la revendication 1 comprenant l'extraction de l'ADN présent dans le plasma sanguin, la purification et l'amplification de l'ADN, et la détection de mutations géniques dans cet ADN.
3. Méthode selon la revendication 2, dans laquelle on détecte les mutations ou délétions d'oncogènes, ou bien les mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs ou encore les modifications géniques propres à l'ADN de cellules cancéreuses.
4. Méthode selon la revendication 3, dans laquelle la détection est appliquée à tout oncogène ou antioncogène ou gène de suppression de tumeurs, par exemple aux gènes APC, ras, DCC ou P53, ou encore aux modifications de microsatellites.
5. Méthode selon l'une des revendications 2 à 4, dans laquelle l'ADN est amplifié par réaction de la polymérase en chaîne (ci-après "PCR").
6. Méthode selon l'une des revendications 2 à 5, dans laquelle la détection des mutations géniques est effectuée par hybridation des produits par PCR avec des sondes oligonucléotiques spécifiques aux mutations.

- 10 -

7. Méthode selon l'une des revendications 2 à 5, dans laquelle la détection des mutations géniques est effectuée par amplification par PCR avec des amplimères spécifiques aux mutations ponctuelles.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Date of application no.
PCT/IB 94/00616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to ECAI PCT classification and IPC.

B. FIELDS SEARCHED

MATERIAL DOCUMENTATION SEARCHED (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

DOCUMENTATION SEARCHED OTHER THAN MATERIAL DOCUMENTATION TO THE EFFECT THAT SUCH DOCUMENTS ARE INCLUDED IN THE FIELDS SEARCHED

Electronics data base consulted during the international search (name of data base and, where applicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	WO,A,93 22456 (TRUSTEES OF DARMOUTH COLLEGE) 11 November 1993 see the whole document ---	1-7
A	US,A,4 871 838 (J.L.BOS ET AL.) 3 October 1989 see column 14, paragraph 2 - column 15, paragraph 1; claims 1-7 -----	6,7

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'B' earlier documents not published on or after the international filing date
- *'C' documents which may serve directly priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another invention or other special reason (if specified)
- *'D' documents referring to an oral exhibition, use, exhibition or other event
- *'E' documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

*'F' later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step over the document or other above documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

*'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 1995

Date of mailing of the international search report

04.04.95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. 3018 Potsdamer 3
D-1000 HV Berlin
Tel. (+ 49 30) 342 2000, Telex 31 631 epo DE
Fax: (+ 49 30) 342 2014

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORTSEARCH NUMBER
PCT/IB 94/00414

Patent document(s) cited in search report	Publication date	Patent family (members)	Publication date
WO-A-9322456	11-11-93	CA-A- 2134552	11-11-93
US-A-1871838	03-10-89	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document number
PCT/IB 94/00414

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/68

Saisir la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIN

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Dominantes principales connues (système de classification en termes des symboles du classement)
CIB 6 C12Q

Documentation fournie autre que la documentation de recherche dans le but de ce document n'est pas destinée aux requêtes à partir de la recherche

Bases de données susceptibles d'être de la recherche bibliographique (liste de la base de données et si celle-ci réalisable, lettres de recherche utilisées)

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Category	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des paragraphes pertinents	No. des références dans
X	VO,A,93 22456 (TRUSTEES OF DARMOUTH COLLEGE) 11 Novembre 1993 voir le document en entier	1-7
A	US,A,4 871 838 (J.L.BOS ET AL.) 3 Octobre 1989 voir colonne 14, alinéa 2 - colonne 15, alinéa 1; revendications 1-7	6,7

Voir la liste du cadre C pour la flèche de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document décrivant l'état général de la technique, non concernant aucunement personne
- "B" document ancien, mais publié à la date de dépôt international ou après celle-ci
- "C" document portant sur un brevet ou une revendication de priorité ou sur une demande déposée la date de publication d'une autre création ou pour une raison spéciale (telle qu'indiqué)
- "D" document se référant à une autre partie brevet, à un usage, à une application ou une autre matière
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et à appartenant pas à l'état de la technique personnelle, mais qui pour comprendre le principe ou la théorie contenue dans le brevet de l'inventeur
- "Z" document postérieurement présenté; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme antérieure une activité inventée par rapport au document précédent
- "Y" document postérieurement présenté; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme antérieure une activité inventée lorsque le document est annexé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison devant s'effectuer pour une personne du métier
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Liens à laquelle la recherche internationale a été effectivement attribuée

22 Mars 1995

Date d'expiration du présent rapport de recherche internationale

040495

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.O. Box 1616 Patenttaan 2
NL - 2200 HV-Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 21 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-2016

Administrateur ad hoc

Gurdjian, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Recherches relatives aux documents de brevets

Demande internationale n°
PCT/IB 94/00416

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets:	Date de publication
WO-A-9322456	11-11-93	CA-A- 2134552	11-11-93
US-A-4871838	03-10-89	AUCUN	